

Über eine neue Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel.

Von

Alexander Nathansohn.

Hauptsächlich durch die grundlegenden Forschungen WINOGRADSKY's sind wir mit der Physiologie einer Anzahl von Organismen bekannt geworden, deren gemeinsame Eigenthümlichkeit in dem kräftigen Oxydationsvermögen für gewisse anorganische Stoffe besteht. Die erste dieser Untersuchungen bezog sich auf *Beggiatoa* und die verwandten farblosen und rothen Bakterien, von denen es schon lange bekannt war, dass sie im Innern der Zellen Schwefelkörnchen ablagern, jedoch ohne dass man sich eine klare Vorstellung über deren Rolle im Stoffwechsel der fraglichen Organismen zu bilden vermochte. WINOGRADSKY¹ zeigte, dass diese Körnchen durch Oxydation von H_2S in der lebenden Zelle entstehen und weiterhin zu Schwefelsäure oxydirt werden.

Ferner machte WINOGRADSKY² es wahrscheinlich, dass das in den Gallerthüllen von *Leptothrix* ausgeschiedene Eisenoxyd ein Stoffwechselproduct dieses Bacteriums ist, indem nämlich intraeellulär Eisenoxydulsalz oxydirt wird, und das entstehende Oxyd zunächst als saures Salz austritt und sodann in der Gallerthülle abgeschieden wird.

Von besonderer Wichtigkeit sind aber WINOGRADSKY's³ Untersuchungen über nitrificirende Bakterien. Bekanntlich wurde durch sie der Nachweis erbracht, dass ein Theil dieser Organismen Ammoniak zu salpetriger Säure, ein anderer salpetrige Säure zu Salpetersäure oxydirt. Ferner gelang der Nachweis, dass von diesen

¹ WINOGRADSKY, Über Schwefelbakterien. in: Bot. Zeit. 45. Bd. 1887 pag. 493 ff.

² Idem, Über Eisenbakterien. Ibid. 46. Bd. 1888 pag. 261 ff.

³ Idem, Recherches sur les organismes de la nitrification. in: Ann. Inst. Pasteur Tome 4 1890 pag. 213 ff., und die folgenden Abhandlungen in der gleichen Zeitschrift.

Organismen auf Kosten der bei jenen Oxydationen frei werdenden Energie organische Substanz durch Reduction von Kohlensäure gebildet wird. Wenn schon HERAEUS und HÜPPE auf Grund ihrer Studien über Nitrification diese Thatsache vermuthet hatten, so gelang doch erst mit Hilfe von Reinculturen der exacte Nachweis dieser Synthese organischer Stoffe auf Kosten chemischer Energie.

Mit diesem letzten Schritte war eigentlich erst in zwingender Weise dargelegt, dass die Oxydation anorganischer Stoffe für die betreffenden Organismen wirklich von fundamentaler Bedeutung ist und nicht etwa einen accessorischen, mehr oder weniger entbehrlichen Process darstellt. Daran knüpft sich eine Anzahl interessanter Probleme in Bezug auf die Mechanik der physiologischen Verbrennung. Vor Allem muss man sich die Frage vorlegen, ob das Oxydationsvermögen dieser Bacterien sich nur auf die betreffenden anorganischen Stoffe erstreckt, oder ob nebenbei noch ein Umsatz organischer Verbindungen stattfindet. Die Versuche, die WINOGRADSKY & OMELIANSKY¹ in dieser Richtung anstellten, führten zu dem Ergebnis, dass bereits geringe Beigaben organischer Substanzen zur Nährlösung die Entwicklung dieser Bacterien benachtheiligen, was, wie noch eingehender ausgeführt werden soll, die Erledigung einiger einschlägiger Probleme unmöglich macht.

Diese Erwägungen, sowie die große Rolle, die derartigen Organismen im Kreislaufe der Elemente zukommt, veranlassten mich dazu, ihnen besondere Aufmerksamkeit zuzuwenden, als ich im verflossenen Jahre im Auftrage der Zoologischen Station eine umfassendere Untersuchung über marine Bacterien unternahm.

Insbesondere erschien mir Einiges über den Stoffwechsel der Schwefelbacterien aus der Verwandtschaft der *Beggiatoa* noch der weiteren Aufklärung bedürftig; ich versuchte daher diesen Organismus so wie nahe Verwandte — große, farblose, bewegliche Bacterien von Stäbchenform, reichlich mit Schwefelkörnchen erfüllt — die häufig in großen Mengen auftraten, in Reincultur zu erhalten. Diese Versuche missglückten; sie führten aber zur Entdeckung einer neuen Gruppe von Schwefelbacterien, die morphologisch mit den gewöhnlichen Bacterien völlig übereinstimmen und sich als sehr günstige Objecte für physiologische Untersuchungen über den Stoff-

¹ WINOGRADSKY & OMELIANSKY, Über den Einfluss der organischen Substanzen auf die Arbeit der nitrificirenden Mikrobien. in: Centralbl. Bact. 2. Abth. 5. Bd. 1899 pag. 329.

wechsel erwiesen. Da es sich um Organismen handelt, die in ihrem Körper niemals Schwefel ablagern, und, wie bemerkt, morphologische Charaktere besonderer Art nicht aufweisen, so konnten ihre Beziehungen zu den S-Verbindungen erst aufgedeckt werden, als die Reincultur gelungen und somit das Studium der Stoffwechselproducte ermöglicht war.

Zum ersten Male sah ich diese Bakterien auftreten, als ich Seewasser, das mit einem Zusatz von Schwefelkalium versehen war, mit jenem *Beggiatoa* ähnlichen Organismus impfte, in der Hoffnung, dieser würde sich darin weiter entwickeln. Dies unterblieb; dagegen beobachtete ich dicht unter der Oberfläche der Nährlösung eine Ansammlung kleiner, lebhaft beweglicher Bakterien, die aber keine Schwefelkörnchen im Innern aufwiesen. Die Regelmäßigkeit, womit diese Organismen wiedererschiene, wenn ich eine Überimpfung in gleichartige Lösungen vornahm, ließen es zweifellos erscheinen, dass sie zu den Schwefelverbindungen in bestimmter Beziehung standen. Da aber die betreffenden Lösungen bei Sauerstoffzutritt sich von selbst unter Entstehung verschiedenartiger Producte oxydiren, so war eine nähere Untersuchung auf diesem Wege nicht möglich. Einen für die Cultur der Bakterien wie für das Studium ihres Stoffwechsels in gleicher Weise günstigen Nährboden erhielt ich indessen, als ich dem Seewasser 0,1—1% unterschweifligsaures Natrium (Natriumthiosulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) hinzufügte oder ähnliche zusammengesetzte künstliche Nährlösungen verwendete, die, wie schon jetzt gesagt werden mag, des Zusatzes organischer Stoffe nicht bedurften. Wurde mit solchen Lösungen Agargallerte hergestellt, so ließen sich die Organismen mit der gleichen Leichtigkeit wie jedes andere Bacterium auf Platten isoliren und in Stiehculturen züchten. So fand ich eine ganze Reihe von Vertretern dieser Gruppe. Die Beschreibung und Abbildung der Formen und Culturen soll bei späterer Gelegenheit erfolgen; in der vorliegenden Mittheilung soll uns der Stoffwechsel dieser Organismen beschäftigen.

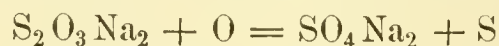
Der Umsatz des Schwefels.

Die Lösungen der unterschweifligsauren Salze sind zwar nicht absolut beständig: sie zerfallen mit der Zeit, je nach Umständen mehr oder weniger rasch, in Schwefel und schwweifligsaure Salze, die sich ihrerseits weiter zu Sulfaten oxydiren. Jedoch beobachtete ich zur Genüge, dass in den für mich in Betracht kommenden Zeit-

räumen (1—3 Wochen) eine freiwillige Zersetzung der Nährlösungen von der oben angegebenen Concentration (zwischen 0,1% und 1%) nicht eintrat: die sterilisirt aufgehobenen Lösungen zeigten selbst beim Stehen am Licht nicht die geringste Trübung durch Ausscheidung von Schwefel.

Anders, wenn eine Lösung von Thiosulfat in Seewasser mit geeignetem Material geimpft wurde, z. B. kleinen Mengen schwefelwasserstoffhaltigen Schlammes vom Meeresboden in der Nähe der Küste: nach 1—2 Tagen zeigte sich auf der Oberfläche der Cultur ein weißes Häutchen. Die mikroskopische Untersuchung lehrte, dass es zum Theil aus Tröpfchen öligen, amorphen Schwefels besteht, wie er bei der Oxydation von H_2S etc. gebildet wird¹, zum Theil aus einfachen stäbchenförmigen Bacterien, die zwischen den meist viel größeren Schwefeltröpfchen liegen und im Innern keine Spur von glänzenden Körnchen aufweisen. Von der Natur der ausgeschiedenen Tröpfchen überzeugt man sich leicht durch die Löslichkeit in Chloroform und Schwefelkohlenstoff, sowie den charakteristischen Geruch nach Schwefeldioxyd, der sich beim Erwärmen auf dem Objectträger bemerklich machte. Dem entspricht das Aussehen der Culturen auf Thiosulfatagar: bei Gussculturen in Petri-Schalen erscheinen, je nach der Art in 1—3 Tagen, Colonien, die je nach der Menge des ausgeschiedenen Schwefels entweder weiß und opak oder durchscheinend und irisirend aussehen. Die Untersuchung derartiger Colonien bei stärkerer Vergrößerung lehrt, dass sie in der gleichen Weise wie die Oberflächenhäutchen auf der Nährlösung aus Schwefeltröpfchen und Bacterien bestehen.

Diese Befunde erschienen zunächst etwas befremdlich. Die Oxydation des Thiosulfates unter Schwefelabscheidung nach der Formel



wäre ja an sich nicht auffällig gewesen; finden wir doch diesen Vorgang im Zerfall des Thiosulfates in Schwefel und Sulfit und der nachträglichen Oxydation des Sulfites realisirt. Befremdlich war es dagegen, dass die Ausscheidung von S ausschließlich außerhalb der lebenden Zellen erfolgte; denn schon das Wachsthum ohne organische Stoffe lehrte, dass die Oxydation des Thiosulfates ein für das Leben der betreffenden Bacterien wichtiger Process sein muss, der sich sicher wenigstens zum Theil intracellulär abspielt.

¹ Vgl. WINOGRADSKY, Schwefelbacterien, l. c. pag. 517 ff.

Die qualitative und quantitative Untersuchung der Stoffwechselproducte brachte die Aufklärung über diesen Punkt, indem sich zeigte, dass die extracelluläre Schwefelausscheidung einem secundären Prozesse entspringt, intracellulär aber die Oxydation des Thiosulfates in ganz anderer Weise vor sich geht.

Zunächst suchte ich die Natur der Oxydationsproducte zu ermitteln und cultivirte zu diesem Zwecke die Bakterien in einer Nährlösung, die Thiosulfat als einzige Schwefelverbindung enthielt. Als günstig ermittelte ich eine Lösung von folgender Zusammensetzung: 3% NaCl, 0,25% MgCl₂, 0,1% KNO₃, 0,05% Na₂HPO₄, 0,2—1% Na₂S₂O₃.

Um kräftige Culturen zu erzielen, ist es vortheilhaft, dieser schwach alkalisch reagirenden Lösung Magnesiumcarbonat hinzuzufügen; Näheres hierüber wird weiter unten pag. 669 gesagt werden. In derartigen Nährlösungen wurden nunmehr die Reinculturen der auf Agarplatten isolirten Bakterien ausgeführt.

In erster Linie ließ sich das Auftreten von Schwefelsäure mit Leichtigkeit beweisen: in der sterilen Culturflüssigkeit ruft bei schwachem Ansäuern Chlorbaryum momentan keinen Niederschlag hervor; erst allmählich, mit fortsehreitender Zersetzung der unterschwefligen Säure bildet er sich; die Culturflüssigkeit, in der das Auftreten der Bakterien an der Bildung des Häutehens gerade zu constatiren war, gab dagegen intensive Schwefelsäurereaction. Daneben war mit Zinksulfat und Nitroprussidnatrium schweflige Säure in sehr geringen Mengen nachweisbar.

Ich unternahm nunmehr die quantitative Untersuchung des Stoffwechsels. Die Abnahme des Thiosulfatgehaltes wurde durch Titration mit Jodlösung ermittelt; bei stärkerer Concentration der Nährlösung verwendete ich n/20 Lösungen, bei schwächerer (0,2% Na₂S₂O₃) n/100 Lösungen, mit denen sich Thiosulfatlösungen noch äußerst scharf titriren lassen. Der Titer der Jodlösung wurde mit einer Thiosulfatlösung ermittelt, die ihrerseits mit Jodkalium und Kaliumbichromat eingestellt worden war¹. Von der geringen Sulfitmenge wurde bei diesen vorläufigen Versuchen abgesehen. Die Bestimmung der Schwefelsäure führte ich in Folge der Zersetzung des Thiosulfates bei saurer Reaction nicht direct aus, sondern behandelte die abfiltrirte Culturflüssigkeit zunächst mit überschüssigem Bromwasser, wodurch das Thiosulfat gänzlich zu Schwefelsäure

¹ FRIEDHEIM, Quantitative chemische Analyse. 5. Aufl. 1897 pag. 101.

oxydirt wird, indem je ein Mol. S_2O_3 zwei Mol. SO_4 ergibt. Die gesammte Schwefelsäure wurde dann in üblicher Weise durch Fällung mit Chlorbaryum und Wägung des $BaSO_4$ bestimmt. Das Decantiren und Auswaschen des Niederschlages muss mit großer Sorgfalt erfolgen, da, wie ich mich überzeugte, sehr leicht $BrNa$ mitgerissen wird; bei genauer Einhaltung der Vorschriften erhält man jedoch von sulfatfreier Nährlösung nach Oxydation mit Brom Werthe, die mit den aus der Titration des Thiosulfates berechneten scharf übereinstimmen (s. unten pag. 664). Von der sich hierbei ergebenden Sulfatmenge zog ich nun die ab, die von der Oxydation des noch in der Lösung befindlichen Thiosulfates herrührte¹; den Rest bezog ich zunächst auf die im Stoffwechsel der Bacterien gebildete Schwefelsäure.

Hierbei ergab sich, dass die so berechnete Sulfatmenge stets größer war, als der Oxydation des verschwundenen Thiosulfates nach der obigen Formel 1 entsprechen hätte. So verschwanden zum Beispiel aus 25 cem der Culturflüssigkeit

$$0,0532 \text{ g } S_2O_3;$$

diese hätten nach Formel 1 ergeben

$$0,0504 \text{ g } SO_4;$$

es fanden sich aber

$$0,0759 \text{ g } SO_4,$$

selbstverständlich nach Abzug der durch die Oxydation des noch vorhandenen Thiosulfates mit Brom entstandenen Schwefelsäure.

In einem anderen Falle waren verschwunden

$$0,0398 \text{ g } S_2O_3;$$

hätten nach Formel.1 ergeben

$$0,0341 \text{ g } SO_4;$$

thatsächlich gefunden

$$0,0460 \text{ g } SO_4 \text{ etc.}$$

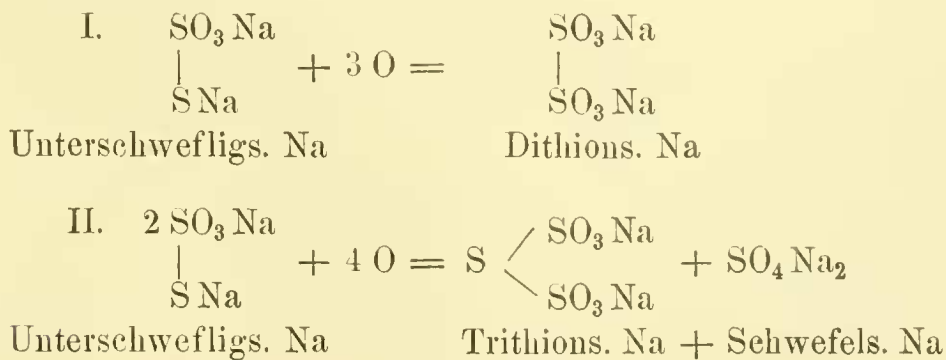
Die einfachste Erklärung dieser Thatsache wäre nun die gewesen, dass intracellulär das Thiosulfat in gleicher Weise wie etwa durch Brom oxydirt wird, wobei also aus einem Molekül $Na_2S_2O_3$

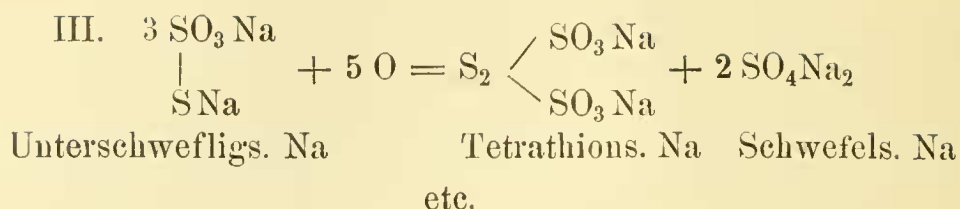
¹ Thatsächlich ist die abgezogene Menge etwas zu groß, weil ein Äquivalent des gleichzeitig in der Lösung vorhandenen Sulfites doppelt so viel Jod verbraucht und halb so viel Schwefelsäure ergibt, wie ein Äquivalent Thiosulfat.

je ein Molekül Na_2SO_4 und H_2SO_4 entstehen würde. Mit dieser Annahme schien die Beobachtung nicht übereinzustimmen, dass bei Culturen in Seewasser + Thiosulfat ohne Magnesiumcarbonat die Culturflüssigkeit ihre schwache Alkalescenz beibehielt. In einer folgenden Versuchsserie wurde daher besonders auf diesen Punkt geachtet. Ich übertrug hierbei die Bakterien in künstliche Nährlösung von der oben angegebenen Zusammensetzung mit 0,5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, gleichfalls ohne Magnesiumcarbonat; in solchen Culturen entwickeln sich die Bakterien zwar etwas langsamer, aber doch in befriedigender Weise (s. hierüber unten pag. 669). Ich stellte fest, dass 25 ccm der Nährlösung 0,4 ccm n_{10} HCl verbrauchten. Diese Alkalescenz fand ich nach zehntägiger Cultur der Bakterien in der Nährflüssigkeit unverändert wieder vor. Die Oxydation des Thiosulfates musste sich also in irgend welcher anderen Weise vollziehen. Bei der Erwägung der verschiedenen Möglichkeiten war das Fehlen elementaren Schwefels, dann das Constantbleiben der Reaction in Betracht zu ziehen, und schließlich mussten die oben mitgetheilten analytischen Resultate Berücksichtigung finden.

Einen Fingerzeig gab mir die Reaction, die bei der Einwirkung von Jod auf Thiosulfat erfolgt: es entsteht nicht Schwefelsäure, sondern es findet eine Condensation zu Tetrathionsäure statt. Da die Tetra- und die anderen Polythionsäuren durch Brom zu Schwefelsäure oxydirt werden, so würden die obigen analytischen Befunde mit einer Bildung dieser Producte nicht im Widerspruche stehen, und wir haben uns nun mit der Frage zu beschäftigen, ob eine derartige Annahme sich mit den beiden anderen Umständen verträgt.

Thatsächlich ergibt sich eine Reihe von Möglichkeiten für die Oxydation des Thiosulfates ohne Ausscheidung von S und Bildung freier Säure; dabei können gemäß den folgenden Gleichungen die verschiedenen Polythionsäuren, eventuell neben Schwefelsäure als Oxydationsproducte auftreten:





Um nun zunächst qualitativ die Polythionate neben Schwefelsäuren und thioschwefelsauren Salzen zu erkennen, benutzte ich ein Verfahren, das auf der Leichtlöslichkeit ihrer Barytsalze und dem Umstande, dass sie nicht durch Jod, wohl aber durch Brom oxydirt werden, beruht.

Am einfachsten gelang der Nachweis, wenn bereits alles Thiosulfat aus der Culturflüssigkeit verschwunden war; das ist bei 0,2%igen Lösungen von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in kräftig wachsenden Culturen oft nach 5—8 Tagen der Fall. Solche Culturflüssigkeit wurde kalt und ohne Ansäuern mit überschüssigem Chlorbaryum versetzt und vom Niederschlage durch ein Filter decantirt. Das Filtrat, das Jodstärkelösung nicht entfärbte, wurde mit Bromwasser versetzt: es entstand abermals ein Niederschlag von Baryumsulfat. Hiermit ist also das Vorhandensein von Salzen einer Säure dargethan, die ein leichtlösliches Baryumsalz aufweist, von Jod nicht angegriffen und durch Brom zu Schwefelsäure oxydirt wird; hierbei kann nur eine der Polythionsäuren in Frage kommen.

War noch nicht alles Thiosulfat aus der Culturflüssigkeit verschwunden, so ließ sich gleichfalls die Existenz von Polythionat in der Lösung nachweisen, nur musste dabei zu quantitativen Methoden gegriffen werden. In Bezug auf die Entfernung der Sulfate verfuhr ich genau in der oben besprochenen Weise. Im Filtrat wurde durch Titiren mit Jodlösung der Thiosulfatgehalt ermittelt, in einer anderen Portion aber das nach Oxydation mit Brom gefällte Baryumsulfat wie üblich durch Wägung bestimmt. Von dem so erhaltenen Schwefelsäurewerth ist der durch Oxydation des Thiosulfates gebildete abzuziehen; der Rest kommt dann auf die Schwefelsäure aus den Polythionaten. Auch bei diesem Verfahren ließ sich das Vorhandensein der letzteren in unzweideutiger Weise demonstrieren; hiervon seien zwei Beispiele angeführt:

- 1) 25 ccm der Culturflüssigkeit enthielten . . . 0,0073 g S_2O_3
 bei totaler Oxydation mit Br würden sich
 daraus ergeben 0,0125 g SO_4
 thatsächlich wurden gefunden 0,0412 g SO_4

2) 25 cem enthielten	0,0068 g S_2O_3
durch Oxydation mit Br würden sich ergeben	0,0108 g SO_4
thatsächlich wurden gefunden	0,0256 g SO_4

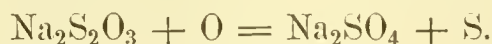
Hiermit ist also die Bildung eines der Polythionate (oder verschiedener derselben neben einander) bewiesen. Bevor wir aber diesen Vorgang in seinen Einzelheiten zu erfassen suchen, müssen wir uns erst der Frage nach der Ursache der extracellulären Schwefelausscheidung zuwenden, auf die wir nunmehr die richtige Antwort zu geben im Stande sind.

Da, wie wir später sehen werden, die von den Bakterien getrennte Culturflüssigkeit oxydirende Eigenschaften besitzt, die sich in anderer Weise mit Sicherheit zu erkennen geben, war ich geneigt, auch diese Schwefelbildung auf eine derartige Oxydation zurückzuführen. Ich überzeugte mich davon, dass, wenn man die Culturflüssigkeit, die mit Hilfe eines Thonfilters nach REICHELDT von den Bakterien getrennt worden war, mit 5% $Na_2S_2O_3$ versetzte, binnen Kurzem ein reichlicher Niederschlag von S auftrat, der hingegen ansah, wenn gleichzeitig 0,1—0,2% Cyankalium hinzugefügt wurden. Letztere Thatsache schien mir insbesondere für eine Oxydation zu sprechen, die durch das reducirende KCy aufgehoben würde. Die Richtigkeit dieser Deutung vorausgesetzt, hätte sich aber unbedingt bei Titration mit Jod eine Abnahme des Titers in der Flüssigkeit zeigen müssen; es fand sich indessen, dass die Änderungen des Titers höchst unsicher waren und schwankten. Die Erklärung hierfür ergab schließlich eine Reaction, über die ich mir in der mir zu Gebote stehenden Litteratur keinen Aufschluss verschaffen kann: versetzte ich eine schwache Lösung tetrathionsauren Natriums (hergestellt durch Einwirkung von Jod auf concentrirte $Na_2S_2O_3$ -Lösung, Ausfällen und Auswaschen des Tetrathionates mit abs. Alcohol) mit $Na_2S_2O_3$, so trat, je nach der Concentration, rascher oder langsamer ein Schwefelniederschlag auf; dabei ließ sich mit Zinksulfat und Nitroprussidnatrium die Bildung von schwefliger Säure nachweisen. Worum es sich im Einzelnen bei dieser Reaction handelt, vermag ich nicht zu sagen. möglicher Weise um eine durch das Tetrathionat beschleunigte Zersetzung des Thiosulfates in Schwefel und Sulfit.

Da, wie sich im Folgenden zeigen wird, Tetrathionsäure als Stoffwechselproduct der Bakterien anzunehmen ist, so dürfen wir vermuthen, dass die extracelluläre Schwefelausscheidung wenigstens zum Theil auf der gleichen Reaction beruht. Ob sich daneben noch

eine Oxydation im oben ausgeführten Sinne geltend macht, ist freilich nicht zu entscheiden. Die Wirkung des Cyankaliums dürfte auf eine Reaction mit dem Tetrathionat zurückzuführen sein: in der That nimmt eine concentrirte Lösung tetrathionsauren Natriums bei Zusatz von KCy eine gelbe Farbe an. Die bei jener Zersetzung des Thiosulfates entstehende schweflige Säure wird dann in den Bacterienculturen oxydirt, wie ihre stets nur geringe Menge anzeigt.

Ich habe nun die Berechnung einer Analyse des gesammten Stoffumsatzes durchgeführt, um zu ermitteln, welche von den Polythionsäuren entsteht. Als Grundlage diente mir hierbei die Thatsache, dass nach den obigen Formeln (pag. 661) das Verhältnis zwischen Polythionsäure und Schwefelsäure von der Natur der ersteren abhängt. Wie dieses Princip benutzt wurde, wird sich am besten bei Besprechung des Beispiels selbst erklären lassen. Ich bemerke nur, dass die Berechnung unter der Voraussetzung durchgeführt wurde, dass an der extracellulären Schwefelsäureausscheidung nur das Thiosulfat durch Zersetzung betheiligt ist. Da die hierbei entstehende schweflige Säure zu Schwefelsäure oxydirt wird, so verläuft der Vorgang schließlich nach der Gleichung



Sollte aber auch ein Zerfall der Polythionate stattfinden, so würden sich Complicationen ergeben, von denen später die Rede sein soll.

Zur Verwendung kam eine Cultur in künstlicher Nährlösung mit Zusatz von etwa 0,5% (krystallisirtem) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Titirt wurde mit $n/100$ Jodlösung. Die Analyse der Culturflüssigkeit ergab folgende Werthe:

1. a) 10 ccm der Culturflüssigkeit verbrauchten
17,2 ccm $n/100$ J. Das entspricht einem Gehalte von 0,0193 g S_2O_3
- b) 25 ccm der Culturflüssigkeit werden mit Brom oxydirt. Die Bestimmung der Schwefelsäure ergibt 0,2010 g $\text{BaSO}_4 = 0,0827$ g SO_4
Aus der gefundenen Thiosulfatmenge berechnet 0,0825 g SO_4

Nach 6 tägiger Cultur filtrirte ich die Nährlösung vom ausgeschiedenen Schwefel ab und nahm im Filtrate die gleichen Bestimmungen vor. Es ergab sich:

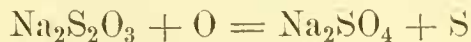
2. a) 10 ccm der Culturflüssigkeit verbrauchten
3,0 ccm $n/100$ J.

b) 25 ccm der Culturflüssigkeit ergaben nach

Oxydation mit Brom . . 0,1481 g BaSO₄ = 0,0611 g SO₄

Von der SO₄ ist die Menge abzuziehen, die durch Oxydation des noch in der Lösung vorhandenen Thiosulfates und Sulfates durch Brom entstanden ist, somit nicht zu den Producten des Bacteriums gehört. Unten pag. 666 werden wir sehen, dass die Sulfitmenge vernachlässigt werden darf, wir beziehen somit die Menge der verbrauchten Jodlösung auf Thiosulfat allein. Es ergibt sich daraus für 10 ccm ein Gehalt von 0,0034 g; in 25 ccm würden durch Oxydation mit Brom daraus entstehen 0,0144 g SO₄; ziehen wir diesen Werth von dem in 2 b gefundenen ab, so verbleiben 0,0467 g SO₄, die der extracellulär gebildeten Schwefelsäure und den durch Brom oxydirten Producten des intracellulären Stoffwechsels entsprechen.

Die Größe des extracellulären Stoffwechsels können wir auf Grund folgender Erwägung ermitteln. Die Differenz des Schwefelsäurewerthes in 1 b und 2 b ist durch den ausgeschiedenen Schwefel bedingt; denn alle in der Culturflüssigkeit außer Sulfaten gelösten Schwefelverbindungen werden wie das Thiosulfat in der ursprünglichen Nährlösung völlig zu Schwefelsäure oxydirt. Die nach der Formel



gebildete Schwefelsäure ist aber dem ausgeschiedenen Schwefel äquivalent. Die Menge der extracellulär gebildeten Schwefelsäure ist daher gerade so groß wie die Differenz von 1 b und 2 b, also = 0,0214 g SO₄; ziehen wir auch diesen Werth von der gefundenen Schwefelsäure ab, so verbleiben aus den Producten des intracellulären Stoffwechsels schließlich 0,0253 g SO₄.

Um nun zu ermitteln, wie viel von dieser Schwefelsäure auf vorgebildetes Sulfat, wie viel auf die Oxydation von Polythionaten durch Brom zurückzuführen ist, wurden die gleichen Bestimmungen in einer Portion der Culturflüssigkeit ausgeführt, die durch Fällung mit Chlorbaryum (in gleicher Weise wie bei der qualitativen Prüfung auf Polythionate vom Sulfat befreit worden war. Zu diesem Zwecke versetzte ich 50 ccm der Flüssigkeit mit 5 ccm 10% BaCl₂-Lösung; ich ließ den Niederschlag wiederum absitzen und benutzte das klare Filtrat zu den folgenden Bestimmungen:

3. a) 10 ccm verbrauchen 2,2 ccm n/100 Jodlösung = 0,0025 g S₂O₃

b) 27,5 ccm (entsprechend 25 ccm der ursprünglichen Lösung ergeben) . 0,0642 g BaSO₄ = 0,0275 g SO₄

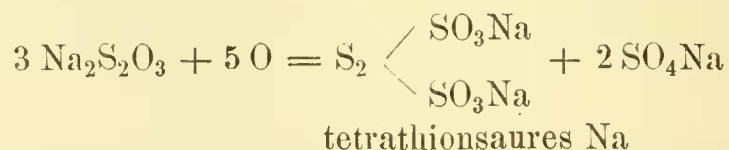
Dazu ist zu bemerken, dass die Titerabnahme der Flüssigkeit sich als etwas größer erwies, als der Verdünnung um 10% entsprechen hätte. Diese Differenz dürfte auf ausgefälltes Baryumsulfit zu beziehen sein. Da aber der Werth sehr gering ist (auf 10 ccm Flüssigkeit 0,5 ccm $n_{100} J = 0,2 \text{ mg SO}_3$), so habe ich ihn nicht weiter in Rechnung gezogen.

Wir haben nunmehr von der Sulfatmenge in 3 b die durch Oxydation des Thiosulfates gebildete Schwefelsäure abzuziehen; sie berechnet sich zu 0,0106 g SO_4 ; es stammen also von der Oxydation des Polythionates 0,0169 g SO_4 .

Nun sahen wir oben, dass die Producte des intracellulären Stoffwechsels bei Oxydation mit Brom 0,0253 g SO_4 ergaben; davon kommen nunmehr auf:

präformirte Schwefelsäure	0,0084 g SO_4 oder 33,2 %
durch Oxydation von Polythionat ent-	
standene Schwefelsäure	0,0169 g SO_4 oder 66,8 %

Das würde völlig mit der Annahme einer Oxydation nach der Formel



übereinstimmen; denn da 1 Mol. Tetrathionat bei der Oxydation 4 Mol. Sulfat ergibt, so würde von der bei Behandlung der Reactionsproducte mit Brom entstehenden Schwefelsäure kommen auf

vorgebildetes Sulfat	33,33..%
durch Oxydation von Polythionat gebildetes	» 66,66..%

Bei dieser Übereinstimmung dürfen wir wohl annehmen, dass die Voraussetzung für die Berechnung richtig ist, also die Producte der eigentlichen Atmung unserer Baeterien Schwefelsäure und Tetrathionsäure sind.

Es erhebt sich nun die Frage, was unter den natürlichen Lebensbedingungen dieser Organismen die Ausgangs- und Endproducte ihres Stoffwechsels sind. Leider lässt sie sich mit voller Bestimmtheit nicht beantworten. Denn im alkalischen Meerwasser ist der Schwefelwasserstoff, der ja der Reduction von Sulfaten seine Entstehung verdankt, nicht im freien Zustande vorhanden, sondern, falls nicht genügend Eisen zu seiner Bindung vorhanden, als Alkalisulfid und

-Sulphydrat. Diese Körper geben aber bei freiwilliger Oxydation u. a. Thiosulfat, so dass ein Gemisch von verschiedenen, unter Umständen zur Ernährung geeigneten Stoffen vorliegt. In der That habe ich mich davon überzeugt, dass sowohl das aus sulfidhaltigem Schlamm ausgepresste Wasser, als auch Seewasser, das mit H_2S gesättigt und der freiwilligen Oxydation überlassen worden war, nach Ausfällen des H_2S mit Kupferchlorid Jodstärkelösung entfärbte; dass ferner, nachdem auch die Sulfate mit Chlorbaryum entfernt worden waren, das Filtrat nach Oxydation mit Brom aufs Neue einen Niederschlag von Baryumsulfat ergab.

Unter diesen Umständen können wir nicht mit Sicherheit entscheiden, ob diese Bakterien in der Natur lediglich das so entstehende Thiosulfat verarbeiten, das ja für sie ein so vorzüglicher Nährstoff ist, oder ob sie daneben direct Sulfide oxydiren. Beachtenswerth ist immerhin, dass bei diesen Formen niemals intracelluläre S-Ausscheidung stattfindet — auch in den noch weiterhin zu besprechenden Culturen auf Natriumsulfidlösungen nicht —, während die Organismen, die sich wie *Beggiatoa* nachweislich von H_2S ernähren, durch die bekannten Schwefelkörnchen charakterisirt sind. Immerhin lassen sich sichere Schlüsse aus dieser Thatsache nicht ziehen; zu entscheiden wären diese Fragen vielleicht an entsprechenden Süßwasserarten — dass sich solche werden auffinden lassen, ist wohl sehr wahrscheinlich —, die mit Schwefelwasserstoffwasser und geringen Mengen anorganischer Salze zu cultiviren wären.

Schließlich will ich bemerken, dass auch in dieser Gruppe möglicher Weise ähnliche Verhältnisse bestehen, wie bei den Nitrit- und Nitratbakterien, wo die letzteren die Stoffwechselproducte der ersteren verarbeiten. Darauf deuten Erfahrungen, die ich letzthin an einer Serie von Mischculturen machte, wo die alkalische Reaction der Nährflüssigkeit auch nach Zusatz von Magnesiumcarbonat rasch verschwindet. Näheres über etwaige specifische Verschiedenheiten dieser Art werde ich bei der ausführlichen Behandlung der verschiedenen Formen dieser Gruppe mitzutheilen Gelegenheit haben.

Der Umsatz des Kohlenstoffs.

Schon oben pag. 656 wurde erwähnt, dass in exacter Weise von WINOGRADSKY der Nachweis geführt worden ist, dass die nitrificirenden Bakterien ihren Kohlenstoffbedarf nicht durch Aufnahme organischer Substanz decken, sondern die Fähigkeit zur Reduction

von Kohlensäure besitzen. Wie im Wesentlichen schon aus den bisher mitgetheilten Culturversuchen zu entnehmen ist und im Folgenden noch besonders gezeigt werden soll, schließen sich unsere Bakterien den nitrificirenden in dieser Beziehung an.

Von diesen Organismen zeigte GODLEWSKI¹, dass sie trotz Zusatzes von Carbonat zur Nährlösung nicht gedeihen, wenn sie keine freie atmosphärische Kohlensäure zur Verfügung haben. WINOGRADSKY & OMELIANSKY² haben dann diesen Befund bestätigt. Unter diesen Umständen dürfte der Zusatz von Carbonat, der wie die letzteren Forscher zeigten, gleichfalls förderlich ist, durch Herstellung einer geeigneten Alkalesceenz wirken.

Diese nach den Untersuchungen der genannten Forscher zweifellos bestehende Eigenthümlichkeit der nitrificirenden Bakterien ist nicht ohne Weiteres verständlich, da ihnen doch auch in der Carbonatlösung in Folge der Hydrolyse dieser Salze freie Kohlensäure zur Verfügung stehen dürfte. In der That haben die nunmehr mitzutheilenden Versuche gezeigt, dass diese Beschränkung bei meinen Schwefelbakterien nicht besteht.

Ich stellte die Versuche in der Weise an, dass je 50 ccm der künstlichen Nährlösung von der oben angegebenen Zusammensetzung in Rundkolben von 150 ccm gefüllt wurden; ich bezeichnete dann durch eine Marke den Stand der Flüssigkeit und fügte schließlich noch 25 ccm destillirtes Wasser hinzu. Nunmehr brachte ich die Flüssigkeit zum Sieden und erhielt sie darin so lange, bis ungefähr die Menge des zugesetzten Wassers wieder entfernt war. Die Kolben wurden dann durch einen Kautschukstopfen mit Natronkalkrohr verschlossen. Nach dem Erkalten wurde die Flüssigkeit mit einer kleinen Menge einer Reincultur geimpft³ und bei einem Theil der Versuche gleichzeitig etwas Magnesiumcarbonat zugefügt. Nunmehr wurde der Kolben durch einen Kautschukstopfen mit Dreiweghahn

¹ GODLEWSKI, O nitryfikacyi. in: Anz. Akad. Krakau; ref. in: Bot. Zeit. 54. Bd. 1891 2. Abth. pag. 177.

² l. pag. 656 c.

³ Man muss von Minimalaussaaten ausgehen, weil sonst leicht die durch den Stoffwechsel der eingebrachten Bakterien veranlasste Schwefelausscheidung geringe Entwicklung vortäuschen kann. Dabei ist es selbstverständlich nothwendig, mit sehr kräftig wachsenden Culturen zu operiren; ferner ist dabei die Impfung von einer anders zusammengesetzten Nährlösung zu vermeiden, da sich diese Bakterien gegen Wechsel der Nährlösung nicht unempfindlich erwiesen. Vgl. A. FISCHER, Empfindlichkeit der Bacterienzelle etc. in: Zeit. Hyg. 35. Bd. 1900.

geschlossen und mit der Wasserstrahlluftpumpe evacuirt. Zuletzt wurde er durch entsprechende Stellung des Dreiweghahns mit Luft gefüllt, die durch zwei Natronkalkröhrchen und eine Waschflasche mit Barytwasser von Kohlensäure befreit worden war.

In den Versuchen ohne Carbonatzusatz blieb nun die Entwicklung aus: die Culturflüssigkeit veränderte sich eben so wenig wie die steril aufgehobene. Daraus geht hervor, dass die Versuchsanordnung, die sich ja nach dem Muster der GODLEWSKI'schen Versuche bei Weitem hätte vervollkommen lassen, für den vorliegenden Zweck genügte. Weder etwa vorhandene Spuren von Kohlensäure, noch von organischer Substanz waren im Stande, hier die Entwicklung der Baeterien zu veranlassen. Bei Zusatz von Magnesiumcarbonat erfolgte jedoch bei viermaliger Wiederholung ausnahmslos eine ebenso kräftige Entwicklung der Culturen, wie ich sie bei der gewöhnlichen Methode ohne Abschluss der atmosphärischen Kohlensäure beobachtete.

Wurden andererseits Culturen ohne Magnesiumcarbonat dem Zutritt atmosphärischer Luft ausgesetzt, wobei ich die Kölbchen nach WINOGRADSKY's Vorgange mit geglühtem Asbest verschloss, so erfolgte gleichfalls Entwicklung der Bacterien, wenn auch bedeutend langsamer als bei Darbietung von Carbonat.

WINOGRADSKY hat in dem von ihm untersuchten Falle den Beweis für die Fähigkeit der Bacterien, Kohlensäure zu reduciren, dadurch vervollständigt, dass er den während des Wachstums der Cultur gebildeten organischen Kohlenstoff durch Oxydation mit einem Gemisch von Chrom- und Schwefelsäure bestimmte. Leider war bei meinen Objecten, die für günstige Entwicklung eines gewissen Chloridgehaltes der Culturflüssigkeit bedurften, diese Methode nicht anwendbar. Nachdem aber bei den nitrificirenden Bacterien der Beweis für die Fähigkeit zur Assimilation mit absoluter Sicherheit geführt worden ist, darf ich die Thatsache, dass in den angeführten Versuchen die Entwicklung der Bacterien von der Anwesenheit des Carbonates, resp. dem Zutritte der atmosphärischen Kohlensäure abhängt, als genügend sichere Grundlage dafür ansehen, dass wirklich Reduction der Kohlensäure, und nicht etwa Ernährung durch unvermeidliche Spuren organischer Stoffe, stattfindet. Überdies werden wir weiterhin erfahren, dass organische Stoffe verschiedener Art, ohne einen schädlichen Einfluss auf die Bacterien auszuüben, doch zu deren Ernährung untauglich sind.

Nachdem wir uns mit der Frage nach der Kohlenstoffquelle

unserer Bacterien beschäftigt haben, müssen wir uns nunmehr einem anderen Probleme zuwenden, nämlich dem des Umsatzes der Kohlenstoffverbindungen. Treten bei diesen Bacterien die Schwefelverbindungen völlig an die Stelle, die bei anderen Organismen die Verbindungen des Kohlenstoffes einnehmen, oder findet noch nebenbei die Oxydation der von den Bacterien selbst gebildeten Kohlenstoffverbindungen statt, um einen Theil der für den Betrieb des Lebens nothwendigen Energie zu liefern?

WINOGRADSKY¹ neigte in seiner ersten Arbeit der letzteren Ansicht zu, ohne sich freilich bestimmt darüber auszusprechen. Er sagt bei Besprechung der von ihm ausgeführten Kohlenstoffbestimmungen in den Culturen nitrificirender Bacterien, dass die dabei sich ergebenden Werthe nicht mit Sicherheit die absolute Menge der assimilirten Kohlensäure, sondern vielleicht nur die Differenz darstellen zwischen der synthetisch gebildeten und wieder verbrannten organischen Substanz.

Einen tieferen Einblick in diese Verhältnisse hätten Culturen gewähren können, in welchen den nitrificirenden Bacterien organische Substanz von außen dargeboten wurde. Derartigen Versuchen stellte sich aber in den fortgesetzten Studien von WINOGRADSKY & OMELIANSKY² eine unüberwindliche Schwierigkeit entgegen: es zeigte sich, dass schon geringe Mengen organischer Substanzen, der Nährlösung hinzugefügt, die Entwicklung der Bacterien hemmten oder gar völlig verhinderten.

In dieser Beziehung boten die Schwefelbacterien ein weit günstigeres Untersuchungsmaterial dar. Sobald ich über Reinculturen verfügte, überzeugte ich mich davon, dass den in gewöhnlicher Weise hergestellten festen und flüssigen Nährböden Rohrzucker und Traubenzucker (ich wandte 0,5%ige Lösungen an) zugefügt werden konnte, ohne die Entwicklung und Oxydationsthätigkeit der Bacterien in irgendwie bemerkbarer Weise zu beeinträchtigen. Es war nun mein Wunsch zu ermitteln, ob unter diesen Bedingungen aus der Glycose Kohlensäure gebildet würde. Ich stellte daher die Versuche so an, dass eine von vorn herein kohlenensäurefreie Nährlösung in Anwendung kam, und die Cultur in abgeschlossenen Kolben erfolgte, deren Luftraum in der oben beschriebenen Weise mit einer CO₂-freien Atmosphäre erfüllt war. Dabei machte ich die Erfahrung,

¹ WINOGRADSKY, Ann. Inst. Pasteur Tome 4 1890 pag. 273.

² l. pag. 655 c.

dass in derartigen Culturen die Entwicklung der Bakterien unterblieb.

Diese Thatsache wurde einer näheren Prüfung unterworfen, wobei ich die Bakterien in Nährlösung mit Zusatz von 0,5% Glycose impfte und sie erst bei Ausschluss von Kohlensäure, dann mit Zusatz von Magnesiumcarbonat, schließlich bei Zutritt der atmosphärischen Kohlensäure cultivirte. Der Ausschluss der atmosphärischen Kohlensäure erfolgte in einer etwas einfacheren Weise, die sich für diese Versuche als genügend erwies. Ich beschickte ERLÉNMEYER-Kölbehen von 150 ccm Kapazität mit 50 ccm Nährlösung und fügte nach Markirung des Flüssigkeitsstandes 25 ccm destillirten Wassers hinzu. Nach dem Sterilisiren wurde die Flüssigkeit so lange gekocht, bis ihre Menge wiederum etwa 50 ccm betrug, und sodann durch einen Kautschukstopfen mit Natronkalkrohr geschlossen. Wurde nach dem Erkalten mit einer geringen Menge einer kräftigen Cultur geimpft, so unterblieb, wie ich mich in zahlreichen Versuchen überzeugte, bei Kohlensäureausschluss die Entwicklung, sie erfolgte aber in den völlig gleich behandelten Parallelculturen, wenn den Bakterien Carbonat oder atmosphärische Kohlensäure zur Verfügung stand.

Ich will ein Beispiel anführen, wo ich bei der Impfung jedem Culturkölbchen mit steriler Pipette eine gewisse Flüssigkeitsmenge entnahm und in je 5 ccm mit $n/20$ Jodlösung den Titer bestimmte; nach 10 Tagen wurde der Versuch abgebrochen, und aufs Neue mit Jod titirt; es zeigte sich dabei, dass in der Reihe A (bei völligem Ausschluss der Kohlensäure) keine Titerabnahme zu constatiren war, wohl aber in der Reihe B, wo die Cultur bei Zutritt atmosphärischer Kohlensäure stattgefunden hatte:

A.		1	2	3	4			
	d. 24. Juni	4,5	4,1	4,3	4,3	ccm	$n/20$	Jodlösung
	d. 4. Juli	4,5	4,0	4,3	4,3	»	»	»
B.		1	2	3	4			
	d. 24. Juni	4,5	4,4	4,4	4,3	ccm	$n/20$	Jodlösung
	d. 4. Juli	3,0	2,1	2,8	2,3	»	»	»

Mit gleichem negativem Erfolge habe ich Culturversuche bei Kohlensäureabschluss in Nährlösungen mit folgenden Zusätzen vorgenommen: 0,5% Rohrzucker, 0,5% Glycerin, 0,2% Kaliumnatriumtartrat, 0,2% Natriumformiat, 0,1% neutr. Kaliumoxalat,

0,2% Harnstoff. Bei Zusatz von Magnesiumcarbonat erwiesen sich alle diese Zusätze als unschädlich für die Entwicklung der Bacterien.

Aus diesen Versuchen geht in erster Linie hervor, dass die Entwicklung unserer Bacterien in einseitiger Weise an das Vorhandensein von Kohlensäure gebunden ist; wir haben einen Fall vor uns, wo wie so oft mit der Entwicklung einer bestimmten Funktion, hier der Kohlensäureassimilation, die Nothwendigkeit für deren Ausübung verknüpft ist. Wir können aber aus diesen That- sachen noch etwas viel Wichtigeres entnehmen, dass nämlich diese Bacterien nicht die Fähigkeit besitzen, einen der oben genannten Stoffe zu Kohlensäure zu oxydiren. Würde in jenen Culturen von den eingebrachten Bacterien auch nur eine Spur von Kohlensäure gebildet werden, so könnte diese ja sofort zum Aufbau neuer Leibes- substanz Verwendung finden, und es würden dann die organischen Substanzen als Kohlensäurequelle gleichzeitig eine Quelle des zum Wachsthum der Organismen nöthigen Kohlenstoffs sein.

Da nun aber unter jenen Stoffen sich auch solche befinden, die, wie z. B. die Glycose, wohl von allen aëroben Organismen mit der größten Leichtigkeit zu Kohlensäure oxydirt werden, so dürfen wir zum mindesten mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, dass diesen Bacterien die Fähigkeit, organische Substanzen in einer physiologisch irgendwie in Betracht kommenden Weise zu oxydiren, fehlt, und dass in der That hier eine anorganische Verbindung, das Thiosulfat, völlig die Rolle vertritt, die sonst den Kohlenstoffverbindungen im Athmungsstoffwechsel zukommt.

Extracelluläre Oxydationswirkungen.

Wenn ich am Schlusse des vorigen Abschnittes betonte, dass »physiologisch in Betracht kommende« Oxydationen organischer Stoffe durch die in Rede stehenden Bacterien nicht ausgeführt werden, so geschah dies im Hinblick darauf, dass gewisse sehr schwache oxydirende Eingriffe, von denen jetzt die Rede sein soll, sich unter Umständen auch auf organische Stoffe erstrecken können.

Den Ausgangspunkt zu den jetzt mitzutheilenden Versuchen bildete die Beobachtung des Wachsthums unserer Bacterien auf Natriumsulfid-Agarplatten. Zu deren Herstellung krystallisirte ich käufliches Schwefelnatrium um; von den hierbei erhaltenen Krystallen (es handelt sich wohl in der Hauptsache um wasserhaltiges Natrium- pentasulfid) setzte ich 0,1% zu Seewasseragar hinzu. Der gelb-

gefärbte Agar ist unmittelbar nach dem Sterilisiren absolut klar. Beim Stehen macht sich eine durch starke Schwefelausscheidung kenntliche, von der Oberfläche nach innen fortschreitende Oxydation bemerkbar.

Wurden nun mit derartigem Agar nach Impfung mit Schwefelbakterien in üblicher Weise Gussplatten hergestellt, so war nach 24 Stunden Folgendes zu bemerken. In einer 1—2 mm dicken Schicht, von der Oberfläche an gemessen, war starke Schwefelausscheidung erfolgt; darunter war der Agar klar und hatte seine gelbe Farbe beibehalten. Bei Untersuchung dieser Platten mit schwachen Vergrößerungen waren junge Bacteriencolonien zu erkennen, die, wenn sie innerhalb der schwefelhaltigen Schicht lagen, stets durch eine Eigenthümlichkeit ausgezeichnet waren: in einer Zone rings um die Colonie waren die Schwefelkörnehen völlig verschwunden. Dagegen trat unterhalb der Colonie in der sonst schwefelfreien Schicht kräftige Schwefelausscheidung ein, und man konnte oft beobachten, wie im Verlaufe nur weniger Stunden diese Ausscheidung eine dicke Wolke bildete.

Es lag nahe, diese Vorgänge auf eine Oxydation zurückzuführen, die durch irgend welche Stoffwechselproducte der Bacterien vermittelt wurde. In der That wird ja der Schwefel in der hier in Betracht kommenden Modification auch bei Suspension im Wasser leicht oxydirt. Leider scheiterten die Versuche, auch diesen Punkt mit Hilfe der Thiosulfatlösungen zu prüfen, an der oben beschriebenen, bei Anwesenheit von Tetrathionat stattfindenden Reaction.

Ich musste mich daher mit dem durch andere Reagentien mit Sicherheit zu erbringenden Beweise extracellulärer Oxydationswirkungen begnügen. Hierbei kamen in Betracht das von WURSTER¹ zuerst angewandte, äußerst empfindliche Tetramethylparaphenyldiamin, ferner Cyanin und Indigcarmin.

Das erstgenannte Reagens wird, in verdünnten Säuren aufgelöst, schon bei Anwesenheit geringster Spuren activirten Sauerstoffs gebläut, bei stärkerer Wirkung entfärbt. Ich verwendete das Reagens in der Weise, dass ich einige kleine Krystalle in 25 cem verdünnter Essigsäure löste, so dass die Lösung beim Schütteln einen schwach bläulichen Schimmer annahm. Wurde im Reagensglase zu dieser Lösung sterile Nährlösung mit Zusatz von Tetrathionat hinzugefügt,

¹ C. WURSTER, Tetramethylparaphenyldiamin etc. in: Ber. D. Chem. Ges. 21. Bd. 1888 pag. 921 ff.

so war keine Änderung des Farbtones wahrzunehmen; fügte ich aber statt dessen Culturflüssigkeit hinzu, in der sich die Bacterien kräftig entwickelt hatten, so nahm das Reagens fast momentan eine tiefblaue Färbung an, die dann allmählich wieder blasser wurde und nach wenigen Minuten ganz verschwunden war. Das Gleiche trat ein, wenn ich vorher die Culturflüssigkeit durch ein Thonfilter nach REICHELT von den Bacterienleibern getrennt hatte. Ich bemerke dazu, dass eine gleichzeitig angestellte Reaction auf salpetrige Säure mit schwefelsaurem Metaphenyldiamin negativ ausfiel.

In den Versuchen mit Cyanin stellte ich eine 1%ige alcoholische Lösung dieses Farbstoffes her und setzte 5 ccm davon zu einem Liter Wasser. Von dieser noch intensiv blau gefärbten Lösung ließ ich je 5—10 ccm in 50 ccm der alkalisch reagirenden Bacterieneulturflüssigkeit und zum Vergleiche in 50 ccm steriler Nährlösung mit Tetrathionatzusatz einfließen; letztere nahm dadurch einen deutlichen blauen Farbenton an, in der ersteren erfolgte fast völlige Entfärbung. Ich überzeugte mich bei dieser Gelegenheit davon, dass ein kleiner Zusatz von Cyankalium sofort die blaue Farbe wieder hervorrief. Dasselbe war der Fall, wenn ich das Cyanin (mit Eisenzusatz) durch Wasserstoffsperoxyd entfärbt hatte, während der Farbenton der frisch bereiteten Cyaninlösung durch KCy nicht geändert wird.

Nachdem durch diese Reactionen die Existenz extracellulärer Oxydationen festgestellt worden war, suchte ich mir über deren Ursache Klarheit zu verschaffen, ohne dass ich jedoch zu einem bestimmten Resultate gelangte. Bekanntlich findet, wie schon SCHÖNBEIN gezeigt hat, in vielen ausgepressten Pflanzensäften Activirung des Sauerstoffes statt, und wir wissen heute, dass diese wohl in den meisten Fällen der Anwesenheit von Oxydationsfermenten zuzuschreiben ist.

In meinem Falle habe ich aber die sonst dabei stets auftretende Bläuung von Guajaetinktur nicht beobachtet; auch wurde das Oxydationsvermögen durch Aufkochen nicht zerstört. Um Wasserstoffsperoxyd kann es sich nicht handeln, da auch das mir zu Gebote stehende Cyaninpräparat von H_2O_2 erst nach Eisenzusatz momentan entfärbt wird. Vielleicht handelt es sich um eine im Stoffwechsel der Bacterien accessorisch entstehende Perschwefelsäure; wir werden auf diesen Punkt noch weiterhin zurückkommen.

Im Anschluss hieran habe ich über Culturversuche zu berichten, die auf Nährlösungen mit Zusatz von Indigearmin angestellt wurden. Zur Prüfung des Oxydationsvermögens der Culturflüssigkeit

benutzte ich auch Lösungen von Indigcarmin mit Eisenzusatz, die in gleicher Weise — nur mit etwas geringerer Empfindlichkeit — wie die oben genannten Reagentien die Anwesenheit activirten Sauerstoffs anzeigen. Bei Verwendung der abfiltrirten Culturflüssigkeit ergab die Prüfung mit diesem Farbstoff ein negatives Resultat; wohl aber trat innerhalb 4—8 Tagen Entfärbung in Culturversuchen ein, die auf gewöhnlicher Nährlösung mit Zusatz von 0,01—0,005 % Indigcarmin und 0,01 % Eisenlactat ausgeführt wurden¹.

Aus Versuchen dieser Art würde sich vielleicht mehr entnehmen lassen, wenn wir etwas Sicheres über die Permeabilität der Bakterien für diesen Farbstoff wüssten und sagen könnten, ob die Entfärbung gleichzeitig auch intracellulärer Oxydation entspringt, so dass sich unter Umständen Anhaltspunkte für die Gesamtmenge des entstehenden activirten Sauerstoffs ergeben würden. In dieser Hinsicht dürfte *Beggiatoa* ein günstiges Object für weitere Studien darstellen, und ich gedenke die Versuche auf dieses Object auszudehnen, sobald mir geeignetes Material zur Verfügung steht.

Kehren wir nun zu der Erscheinung zurück, die den Ausgangspunkt der in diesem Abschnitte mitgetheilten Versuche bildete, so dürfte sie, da sich die extracelluläre Oxydationsthätigkeit mit Sicherheit demonstrieren ließ, darin ihre wahrscheinlichste Erklärung finden.

Zur Theorie des abbauenden Stoffwechsels.

Nachdem wir oben pag. 671 gezeigt haben, dass bei unseren Schwefelbakterien das Thiosulfat genau die Stelle der Kohlenstoffverbindungen im Athmungsstoffwechsel der übrigen Pflanzen einnimmt, so erübrigt es noch, die Erscheinungen in beiden Fällen kurz von gemeinsamen Gesichtspunkten aus zu beleuchten.

Als Quelle der Athmungskohlensäure sind in der Hauptsache Processe von zweierlei Art in Anspruch genommen worden: namentlich WORTMANN² und DETMER³ haben die Anschauung vertreten,

¹ Ähnliche Resultate erhielt PFEFFER bei fortgesetzter Cultur von *Penicillium* auf Nährlösung mit Indigozusatz (Beiträge zur Kenntniss der Oxydationsvorgänge etc. in: Abh. Math.-Physik. Cl. Sächs. Ges. Wiss. 15. Bd. 1889 pag. 471 f.).

² WORTMANN, Über die Beziehungen der intramolecularen zur normalen Athmung. in: Arb. Bot. Inst. Würzburg 2. Bd. 1882 pag. 500.

³ DETMER, Das Wesen des Stoffwechselprocesses im vegetabil. Organismus. in: Jahrb. Wiss. Bot. 12. Bd. 1881 pag. 237 ff.

dass sie dem Zerfall lebendiger Plasmatheilehen entspringt, und dass die bei der Athmung verbrauchten Stoffe, sowie der Sauerstoff erst secundär in den Process hineingezogen werden, wo sie zur Ausfüllung der beim Zerfall dienenden Lücken dienen. Dem gegenüber steht die Vorstellung, dass die Athmung auf einer mehr oder weniger directen, durch das lebende Protoplasma vermittelten Oxydation beruht. Dass die erstgenannte Vorstellung mit gewissen Erfahrungen über die intramoleculäre Athmung nicht vereinbar ist, wurde von PFEFFER¹ ausgeführt; u. A. handelt es sich um Erfahrungen an Schimmelpilzen, die bei Anwesenheit vergährungsfähigen Zuckers zu intramoleculärer Athmung im sauerstofffreien Raume befähigt sind, dagegen die Kohlensäureabgabe zugleich mit Entziehung des Sauerstoffes sistiren, sofern sie in anderer, bei Sauerstoffzutritt völlig ausreichender Weise ernährt werden.

In Fällen, wie sie bei Schwefelbakterien und nitrificirenden Bacterien vorliegen, dürfte schon die Beschaffenheit der Ausgangs- und Endproducte für die Vorstellung sprechen, dass die Athmung wesentlich in der Vermittelung der Oxydation besteht, und für die Annahme eines dabei stattfindenden Zerfalles lebender Theilchen zum mindesten keine Veranlassung besteht.

Übrigens spricht im vorliegenden Falle ein Umstand für eine ziemlich direct vor sich gehende Oxydation des Thiosulfates; nämlich das Auftreten von Tetrathionsäure als Oxydationsproduct, das wir in gleicher Weise bei der Einwirkung von Jod und auch von Persulfaten² auf Thiosulfate entstehen sehen. Von vorn herein wäre es ja auch denkbar gewesen, dass die Thätigkeit des Protoplasmas sich in diesem Falle auf die Zerlegung des Thiosulfates in autoxydable Stoffe beschränkte, wie etwa schwefligsaures Salz und Schwefelwasserstoff; dann hätten wir aber als Oxydationsproduct nur Schwefelsäure zu erwarten gehabt.

Etwas Entscheidendes über die Mechanik der Oxydation vermag ich nicht beizubringen, und darum erscheint auch die allseitige Erörterung der sich dafür ergebenden Möglichkeiten nicht geboten³. Ich will nur auf einen Punkt hinweisen, der sich an unsere Beobachtungen über die extracelluläre Oxydation anschließt.

¹ PFEFFER, Über intramoleculare Athmung. in: Unters. Bot. Inst. Tübingen 1. Bd. 1885 pag. 656 ff.

² MARSHALL, Darstellung von Persulfaten. in: Journ. Soc. Chem. Ind. Vol. 16; Ref. in: Chem. Centralbl. 1897? pag. 173.

³ Vgl. darüber PFEFFER, Intramoleculare Athmung l. pag. 676 c. pag. 673 ff.; Oxydationsvorgänge l. pag. 675 c. pag. 480 ff.; Pflanzenphysiologie pag. 547 ff.

Activirter Sauerstoff als Ursache der Athmung ist schon von SCHÖNBEIN angenommen worden. Dagegen hat PFEFFER¹ an einer Reihe von Objecten das dauernde Fehlen activirten Sauerstoffes im Protoplasma nachgewiesen: das geschah 1) durch die Beobachtung, dass die Aufnahme geringer Mengen von Wasserstoffsperoxyd in einigen Zellen Reactionen hervorrufft, die normal nicht eintreten; 2) dadurch, dass Cyanin sich im lebenden Protoplasma erhält, aber darin momentan bei Darbietung verdünnter Lösungen von H₂O₂ entfärbt wird.

Wenn wir nun in unserem Falle die Existenz activirten Sauerstoffes in der Culturflüssigkeit mit Bestimmtheit nachgewiesen haben, so lässt sich daraus nichts Sicheres über die Verhältnisse in der Zelle, über die Bedeutung dieser Thatsache für die Athmungsmechanik entnehmen. Es handelt sich, wie schon angedeutet, vielleicht um ein accessorisch gebildetes Peroxyd. Doch dürfen wir die Möglichkeit nicht außer Acht lassen, dass in diesen Fällen, wo es sich um die Verathmung anorganischen Materials handelt, vielleicht andere Verhältnisse obwalten, als bei den übrigen Pflanzen. In wie weit eine Fortsetzung dieser Versuche möglich und beabsichtigt ist, wurde oben bereits angedeutet.

Wir haben uns jetzt der Besprechung eines anderen auf den abbauenden Stoffwechsel bezüglichen Punktes zuzuwenden. Wir sahen, dass wir zum mindesten mit sehr großer Wahrscheinlichkeit annehmen dürfen, dass die Oxydationsthätigkeit unserer Bacterien sich auf das anorganische Nährmaterial erstreckt; dass ferner für die Annahme eines damit verknüpften Zerfalles lebendiger Theilchen kein Grund vorhanden ist. Es fragt sich nun, ob mit jener Oxydation der abbauende Stoffwechsel in seinem gesammten Umfange gegeben ist, oder ob noch ein Glied hinzutritt, das heute vielfach als mit den Lebensvorgängen untrennbar verknüpft hingestellt wird: der Eiweißzerfall. So bezeichnet z. B. REINKE² den Eiweißzerfall als eine ganz allgemeine Kraftquelle der lebenden Organismen, viel allgemeiner noch als die Sauerstoffathmung, weil er auch den anaëroben Organismen zukommt. Dem gegenüber ist es nicht unangebracht, einen Blick auf das zu werfen, was wir thatsächlich über den Eiweißzerfall bei den Pflanzen wissen, und uns im Anschluss daran zu fragen, ob wir wirklich dazu berechtigt sind,

¹ Oxydationsvorgänge I. pag. 675 c. pag. 430 ff.

² REINKE, Theoretische Biologie pag. 290.

ihn als nothwendiges Glied in der Kette der Lebensprocesse anzusehen.

Unsere Kenntnisse vom Zerfall der Eiweißkörper in der Pflanze nehmen im Wesentlichen ihren Ausgang von einer Untersuchung PFEFFER'S¹ an keimenden Leguminosensamen. Wie sich daran die zahlreichen Arbeiten von E. SCHULZE und seinen Schülern schlossen und Aufklärung über die Modalitäten dieses Processes brachten, ist bekannt. So sehr aber durch all diese Arbeiten die Stoffwechselphysiologie der Pflanzen gefördert worden ist — sie den allgemeinen physiologischen Vorstellungen über den Eiweißzerfall im Protoplasma zu Grunde legen zu wollen, wie es z. B. DETMER² gethan hat, wäre verfehlt. Denn es handelt sich dabei um nichts Anderes als um die Mobilisirung von Reservestoffen; in jüngster Zeit zeigte ja E. SCHULZE³, dass das Wesen des gesammten Processes in der Spaltung der Eiweißkörper und synthetischen Bildung eines für Speicherung und Wanderung geeigneten Stoffes, eben des Asparagins besteht, wie gleichzeitig in den keimenden Samen die Stärke hydrolysiert, und aus den Producten der Hydrolyse Rohrzucker synthetisch dargestellt wird.

Scheiden wir nun alle die Arbeiten aus, die sich auf die Mobilisirung der Reserveeiweißstoffe beziehen, so bleibt herzlich wenig zurück. Das hat seinen guten Grund: das Studium des Eiweißzerfalles in der erwachsenen Pflanze begegnet der principiellen Schwierigkeit, die in ihrer Fähigkeit der Eiweißsynthese begründet liegt; und so ist es a priori sehr wohl denkbar, dass ein fortdauernder Zerfall und Wiederaufbau stattfindet, der unserer Beobachtung entzogen bleibt.

Erst dann wird das Auftreten von Eiweißzerfallsproducten nachweisbar, wenn wir der Pflanze die Möglichkeit zum Wiederaufbau der Eiweißkörper nehmen. Das erreichte BORODIN⁴ dadurch, dass er grüne Sprosse ins Dunkle brachte und nach einiger Zeit die Anhäufung von Asparagin nachweisen konnte. Diesen Versuchen gegenüber müssen wir aber fragen, ob nicht gerade durch den Umstand, der im Dunkeln die Wiederbildung der Eiweißkörper verhindert, nämlich den sich bald einstellenden relativen Mangel an Kohle-

¹ PFEFFER, Untersuchungen über die Proteinkörner. in: Jahrb. Wiss. Bot. 8. Bd. 1872 pag. 429.

² l. c.

³ E. SCHULZE, Über den Umsatz der Eiweißstoffe in den höheren Pflanzen. in: Zeit. Phys. Chemie 30. Bd. 1900 pag. 306.

⁴ BORODIN. in: Bot. Zeit. 1878 pag. 801.

hydraten, erst regulatorisch der Zerfall der Eiweißstoffe ausgelöst wird; die Erfahrungen am Körper der höheren Thiere, wo reichlicher Verbrauch der Kohlehydrate den Eiweißzerfall einschränkt, sprechen für diese Deutung.

Wenn also auch diese Versuche einen sicheren Schluss nicht zu ziehen erlauben, so spricht endlich eine dritte Gruppe von Thatsachen deutlich gegen die Annahme eines fortdauernden Eiweißzerfalles. ZALESKI¹ fand, dass in Zwiebeln zu gewissen Zeiten der Aufbau von Eiweißstoffen aus gespeicherten Amidn und Kohlehydraten rasch erfolgt. Wurden aber derartige Objecte in den sauerstofffreien Raum versetzt, so blieb ihr Eiweißgehalt constant. ZALESKI zieht daraus den Schluss, dass die Fähigkeit zur Eiweißsynthese an die Fortdauer der Sauerstoffathmung gebunden ist. Daraus würde sich aber auch die weitere Consequenz ergeben, dass in den intramoleculär athmenden Zwiebeln kein Eiweißzerfall erfolgt, der sich sonst durch eine Abnahme der Gesamtmenge der Eiweißkörper hätte bemerklich machen müssen. In gleicher Weise wären ältere Versuche PALLADIN's² zu deuten, wo der Eiweißgehalt intramoleculär athmender Weizenkeimlinge keine nachweisbaren Veränderungen erfuhr. Wollten wir aber die Annahme machen, dass der »physiologische Eiweißzerfall« in einer Weise erfolgt, welche den Wiederaufbau auch im O-freien Raume erlaubt, so würden wir uns ganz vom Boden der Thatsachen entfernen.

Mit diesen Ausführungen soll keineswegs die Möglichkeit des »physiologischen« Zerfalls der Eiweißkörper geleugnet werden; ich wollte nur andeuten, dass zwingende Gründe oder auch nur Argumente für die Annahme eines derartigen Vorganges in der Pflanze zur Zeit nicht vorliegen; jedenfalls bedarf es kritischer Untersuchungen auf diesem Gebiete.

Wenn ich also der Ansicht zuneige, dass in den Schwefelbakterien und ähnlichen Organismen die Oxydation der anorganischen Substanz wirklich das einzige Glied des abbauenden Stoffwechsels darstellt, so möchte ich damit nicht einer allzu »einfachen« und groben Vorstellung dieses Processes das Wort reden. Die Thatsache der chemosynthetischen Kohlensäure-Assimilation lehrt, wie mir scheint, eben so wie jede andere unter Aufwand chemischer Arbeit

¹ ZALESKI in: Ber. d. D. Bot. Ges. 16. Bd. 1898 pag. 146 und 19. Bd. 1901 pag. 331.

² PALLADIN, Über Eiweißzersetzung in den Pflanzen bei Abwesenheit von Sauerstoff. *ibid.* 6. Bd. 1888 pag. 205 ff.

vor sich gehende Synthese, dass die bei der Oxydation frei werdende Energie wenigstens zum Theil nicht als Wärme auftritt, sondern sofort transformirt und dazu verwendet wird, Körper von hohem chemischem Energiepotential zu schaffen. Daraus dürfte folgen, dass die Oxydation nicht in der das Plasma durchtränkenden Flüssigkeit, etwa durch ausgeschiedene Enzyme, erfolgt, sondern im engsten Verbande mit den lebenden, zur Energietransformation befähigten Theilehen vor sich geht. Sich diese Vorgänge näher ausmalen zu wollen, wäre müßig; ich will nur daran erinnern, dass offenbar für die Transformation chemischer Energie in mechanische Ähnliches gilt. Zwar wissen wir über diese Transformation in der Pflanze nichts, denn hier ist die nach außen geleistete Arbeit gering, und von der Innenarbeit des Protoplasmas haben wir gar keine Vorstellung. Wenn also in den Untersuchungen RODEWALD'S¹ unter Umständen die ganze bei der Athmung freiwerdende Energie als Wärme zum Vorschein kam, so ist daraus nicht zu entnehmen, ob diese direct den chemischen Vorgängen entstammt, oder ob die chemische Energie zuerst in actuelle mechanische verwandelt worden war. Dass aber im thierischen Körper die Annahme einer directen Verwandlung chemischer Energie in mechanische nothwendig ist, weil sich sonst kaum haltbare Consequenzen ergeben würden, hat namentlich FICK² betont, der sich seinerseits aus diesem Grunde der PFLÜGER'schen Vorstellung vom Zerfall lebendiger Theilehen bei der Athmung anschloss.

Neapel, Zoologische Station, Juli 1902.

¹ RODEWALD, Quantitative Untersuchungen über die Wärme- und Kohlen-säureabgabe etc. in: Jahrb. Wiss. Bot. 18. Bd. 1887 pag. 263, und die folgenden Abhandlungen in Bd. 19 u. 20 dieser Zeitschrift.

² FICK, Einige Bemerkungen zu ENGELMANN'S Abhandlung etc. in: Arch. Gesamte Phys. 53. Bd. 1892 pag. 606 ff.